

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月20日現在

機関番号：17102  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23770123  
 研究課題名（和文） 抗ヒスタミン薬の阻害機構解明に向けたヒスタミン受容体の高分解能結晶構造解析  
 研究課題名（英文） Elucidating of inhibition mechanism of anti-histamines for the histamine receptor by X-ray crystallography.  
 研究代表者  
 白石 充典（SHIROISHI MITSUNORI）  
 九州大学・薬学研究院・助教  
 研究者番号：00380527

## 研究成果の概要（和文）：

我々は出芽酵母 (*S. cerevisiae*) と緑色蛍光蛋白質 (GFP) を用いた GPCR 改変体の構築・評価系を確立し、従来の3分の1程度の期間で改変体構築から発現評価までを行うことを可能とした。この改変体構築・評価系を用いることで、GPCR の一つであるヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体 (H<sub>1</sub>R) の大量調製に成功し、第一世代の抗ヒスタミン薬ドキシセピンとの複合体構造を明らかにした。さらにこの立体構造より受容体選択性にかかわる新たなアニオン結合部位を見出した。

## 研究成果の概要（英文）：

We developed a platform using budding yeast (*S. cerevisiae*) and green fluorescent protein (GFP) for the rapid construction and evaluation of GPCR variants for structural studies. This platform cut the process time in one third. We produced a stable and highly-expressed histamine H<sub>1</sub> receptor (H<sub>1</sub>R) using this platform. We determined the crystal structure of the H<sub>1</sub>R in complex with doxepin, an inverse agonist antihistamine. The H<sub>1</sub>R structure provides key information that should aid the development of highly selective antihistamines.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,600,000	1,080,000	4,680,000

## 研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：G 蛋白質共役型受容体，結晶構造解析，機能解析

## 1. 研究開始当初の背景

ヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体 (H<sub>1</sub>R) はアレルギー症状の主な要因となっていることから、創薬の大きなターゲットとなっている。抗アレルギー薬として用いられる抗ヒスタミン薬 (H<sub>1</sub>R 阻害剤) は、他の受容体においても阻害効果を示し、抗コリン作用などの副作用を引き起こすことが知られている。H<sub>1</sub>R の立体構造を高分解能で明らかにし、抗ヒスタミン薬の阻害機構を明らかにすることで、より選

択性の高い治療薬の開発に結び付く有力な情報が得られると考えられる。

申請者は出芽酵母のプラットフォームを用いて H<sub>1</sub>R 改変体の作製を行ったところ、N 末端と細胞内第 3 ループを削除した改変体 (Nd-i3d)、および N 末端を削除し細胞内第 3 ループに T4 リゾチームを融合した改変体 (Nd-T4L) において、野生型よりも顕著なリガンド結合活性の向上が見られた。最終的に発現宿主をピキア酵母に移し、H<sub>1</sub>R-T4L の大

量精製系の確立に至った。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、 $H_1R$  とその阻害剤である抗ヒスタミン薬の複合体構造を X 線結晶構造解析により高分解能で決定し、抗ヒスタミン薬の阻害機構を原子レベルで明らかにすることである。

本研究ではピキア酵母で発現した  $H_1R$ -T4L を用いて、(1) 精製時の界面活性剤濃度の最適化、(2) 結晶化条件の最適化、(3)  $H_1R$ -T4L 変異体コンストラクトの検討、(4) 精製条件の最適化を検討することで分解能の向上を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 培養、精製および結晶化条件の最適化

pH や温度、あるいはジメチルスルホキシド (DMSO) 等の添加剤を加えることで、培養条件の最適化を行う。 $H_1R$ -T4L はピキア酵母の細胞膜を可溶化し、金属キレートアフィニティークロマトグラフィーにより精製し、TEV プロテアーゼを用いて、C 末端に融合した GFP を切断する。

精製し特に高い界面活性剤の濃度はキュービック相の形成に影響を与えるため、界面活性剤濃度に注意しながら精製を行う。界面活性剤濃度が高いと思われる場合、最終精製にゲルろ過を行うことで界面活性剤濃度を下げる。

キュービック相形成の条件が狭く、結晶化において pH、温度、沈殿剤濃度をあまり変えることができないため、添加剤として用いる種々のイオンや界面活性剤が重要となるが、初期スクリーニングの結晶化条件を基に、微調整することでより良い結晶を作製する。

### (2) コンストラクトの検討

現在の  $H_1R$ -T4L 変異体は C 末端に GFP を融合しているため、精製の途中の段階で GFP を TEV プロテアーゼで切断し、取り除いている。このステップが結晶性に影響を及ぼしている可能性もあるため、GFP を除いたコンストラクトを作製し TEV プロテアーゼ処理のステップを除いた精製方法も試す。

結晶構造が解明された  $\beta 2$  アドレナリン受容体 (ADRB2) とアデノシン A2a 受容体 (ADORA2a) では、T4 リゾチームを融合する位置が N 末端側で 1 残基異なるのみだが、結晶中での T4L の配向は大きく異なっていた。そこで  $H_1R$  においても、結晶中でのパッキングを改善し高分解能の回折データ取得を目指すため、T4 リゾチームを融合する位置 (N 末端側、C 末端側) を 1 残基長くまたは短くした変異体 4 種類を作製した。

## 4. 研究成果

### (1) ピキア酵母による $H_1R$ -T4L 発現条件の最適化

pH や温度、あるいはジメチルスルホキシド (DMSO) 等の添加剤を加えることで、培養条件の最適化を行った。さらにリガンドを培地中に添加することで発現量の大幅な向上が見られた (図 1)。また安定に精製するため、精製の全ての段階でリガンドを添加して行った。

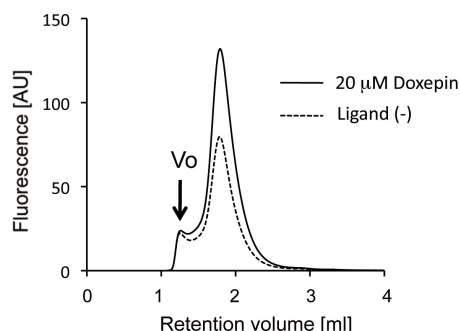


図 1 リガンド存在下 (実線) および非存在下 (点線) における  $H_1R$ -T4L の発現量の変化

### (2) 結晶化と構造解析

結晶化および構造解析は、京都大学医学研究科の岩田研究室、Scripps 研究所、および Diamond 放射光施設の協力のもとで行われた。精製した  $H_1R$ -T4L 結晶化を高濃度に濃縮し、モノオレインを用いたキュービック相結晶化法により結晶化と行った。インバースアゴニストである Doxepin と  $H_1R$  の複合体の結晶化は、26-30% (v/v) PEG400, 300 mM リン酸アンモニウム, 10mM 塩化マグネシウム, 100 mM クエン酸ナトリウム pH 4.5 の周辺条件でおこなった。また回折データ収集は英国 Diamond 放射光施設のマイクロフォーカスビームを用いて行い、分解能 3.1Å で構造決定した。

### (3) $H_1R$ の全体構造

$H_1R$ -Doxepin 複合体の全体構造は、GPCR に共通して見られるように、7 本の膜貫通ヘリックスと 1 本の両親媒性ヘリックスで構成されていた (図 2)。主鎖の  $C\alpha$  原子の平均二乗偏差 (RMSD) を他の GPCR と比較したところ、膜貫通領域の構造は  $\beta 2$  アドレナリン受容体やドーパミン D3 受容体といったアミン受容体に近く、ロドプシン、アデノシン A2a 受容体あるいは CXCR4 ケモカイン受容体といった系統的に異なる受容体とは離れていた。特に細胞外第 2 ループ部分に大きな構造の違いが見られ、これによりヘリックス 3 と 5 の端の部分に、他の受容体と比較して

大きな構造の相違が見られた。第3ヘリックスのD(E)RYモチーフのアルギニン(R125)は第6ヘリックスの6.30位のグルタミン酸(E410)との間でIonic-lockを形成しておらず、その代わりに6.36位のグルタミン残基(Q416)と水素結合を形成していた。

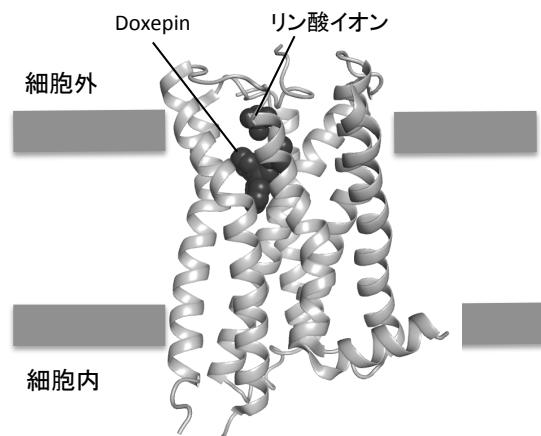


図2 H<sub>1</sub>R-Doxepin 複合体の全体構造

#### (4) Doxepin との結合部位の構造

Doxepin は特異性の低いインバースアゴニストである。Doxepin は H<sub>1</sub>R と高い親和性(解離定数で約 0.3nM) で結合するが、多くのアミン受容体とも無視できない親和性(解離定数で数十～数百 nM) で相互作用する。構造解析の結果、Doxepin は主にヘリックス 3, 5, 6 の残基で形成されるポケット深くに結合していた。また他のアミン受容体でも共通して見られるように、第3ヘリックスのアスパラギン酸(Asp1073.32)とDoxepinのアミノ基がイオン結合を形成していた。ジベンゾオキセピン環の部分は、ロドプシン以外のGPCRリガンドと比較して5Å以上深い位置に結合しており、GPCRの活性化に重要で保存性の高いトリプトファン(W428)と直接相互作用することでH<sub>1</sub>Rの機能を阻害していると考えられる。またDoxepinが相互作用する残基を受容体間で比較したところ、アミン受容体で保存性の高い残基と多く相互作用していることが明らかとなった(図3)。つまり本立体構造から、Doxepinの低い受容体特異性が、多数の保存性の高いアミノ酸残基との相互作用に起因するということが明らかとなった。

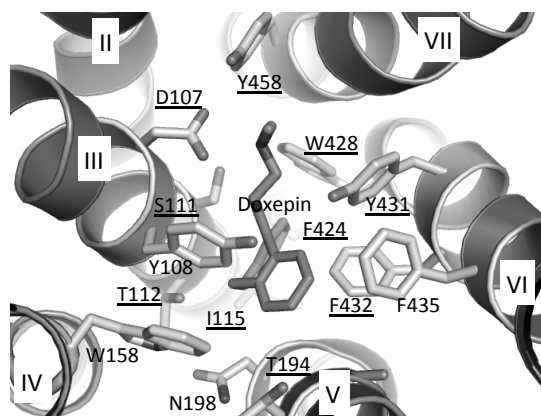


図3 Doxepin 結合部位周辺の構造

#### (5) アニオン結合部位

今回の結晶構造から、H<sub>1</sub>Rの細胞外領域に、Lys179, Lys191 および His450 といった、H<sub>1</sub>受容体に特異的な塩基性アミノ酸残基で構成されたアニオン結合サイトが見つかった(図4)。結晶中でこの部位にはリン酸イオンが強く結合していた。リン酸イオンの存在下/非存在下で熱安定性を比較したところ、リン酸イオンの存在下で熱安定性が4~5°C上昇しており、この結合は生化学的にも示された。

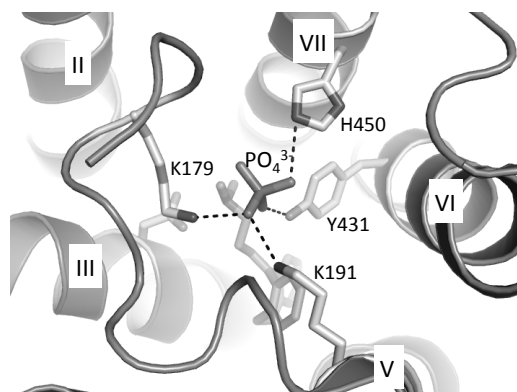


図4 アニオン結合部位

特異性の高い第2, 第3世代の抗ヒスタミン薬の中には、官能基としてカルボキシル基を有しているものがある。立体構造をモデルにこれらの抗ヒスタミン薬の結合をシミュレーションにより解析したところ、このカルボキシル基がアニオン結合サイトに結合することが予想された。実際にその中の一つであるCetirizineを用いて、H<sub>1</sub>Rの熱安定性解析を行ったところ、リン酸の存在下においても熱安定性の向上は見られなかった。おそらくCetirizineのカルボキシル基がアニオン結合サイトに結合し、リン酸イオンが結合できなくなっているためではないかと考えられる。このアニオン結合サイトはH<sub>1</sub>受容体に特徴的な部分であるため、特異性の高い薬剤開発の標的部位になりうると思われる。

(6) 分解能の更なる向上を目指した改変体の作製

さらなる高分解能の構造解析を目指して、T4 リゾチームの融合位置を変えた改変体を4種類作製し、これらの *Pichia* 酵母を用いた大量調製系を確立し、現在結晶化を試みている。また他の融合蛋白質の検討等を行っている。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

(1) Haga K, Kruse AC, Asada H, Yurugi-Kobayashi T, Shiroishi M, Zhang C, Weis WI, Okada T, Kobilka BK, Haga T, Kobayashi T. "Structure of the human M2 muscarinic acetylcholine receptor bound to an antagonist." *Nature* 482, 547-551 (2012)

(2) Shiroishi M, Kobayashi T, Ogasawara S, Tsujimoto H, Ikeda-Suno C, Iwata S, Shimamura T. "Production of the stable human histamine H1 receptor in *Pichia pastoris* for structural determination." *Methods* 55, 281-286 (2011)

(3) de Graaf C, Kooistra AJ, Vischer HF, Katritch V, Kuijjer M, Shiroishi M, Iwata S, Shimamura T, Stevens RC, de Esch IJ, Leurs R. "Crystal structure-based virtual screening for fragment-like ligands of the human histamine H(1) receptor." *J Med Chem.* 54, 8195-8206 (2011)

(4) Kojima R, Kajikawa M, Shiroishi M, Kuroki K, Maenaka K. "Molecular Basis for Herpesvirus Entry Mediator Recognition by the Human Immune Inhibitory Receptor CD160 and Its Relationship to the Cosignaling Molecules BTLA and LIGHT." *J Mol Biol.* 413, 762-772 (2011)

(5) Shimamura T\*, Shiroishi M\*, Weyand S, Tsujimoto H, Winter G, Katritch V, Abagyan R, Cherezov V, Liu W, Han GW, Kobayashi T, Stevens RC, Iwata S. "Structure of the human histamine H(1) receptor complex with doxepin." *Nature* 475, 65-70 (2011). \*These authors contributed equally to this work.

(6) Tokuda N, Igarashi K, Shimamura T, Yurugi-Kobayashi T, Shiroishi M, Ito K, Sugawara T, Asada H, Murata T, Nomura N, Iwata S, Kobayashi T. "Cloning, expression and

purification of the anion exchanger 1 homologue from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*." *Protein Expr Purif.* 79, 81-87 (2011)

(7) Asada H, Uemura T, Yurugi-Kobayashi T, Shiroishi M, Shimamura T, Tsujimoto H, Ito K, Sugawara T, Nakane T, Nomura N, Murata T, Haga T, Iwata S, Kobayashi T. "Evaluation of the *Pichia pastoris* expression system for the production of GPCRs for structural analysis." *Microb Cell Fact.* 2011 Apr 22;10:24

(8) Shiroishi M\*, Tsujimoto H, Makyio H, Asada H, Yurugi-Kobayashi T, Shimamura T, Murata T, Nomura N, Haga T, Iwata S\* Kobayashi T\* "Platform for the rapid construction and evaluation of GPCRs for crystallography in *Saccharomyces cerevisiae*" *Microb Cell Fact.* 11:78 (2012)  
\*Corresponding authors

[学会発表] (計 8 件)

1. 白石充典, 島村達郎, 辻本浩一, 浅田秀基, 小林(万木)貴美, 小林拓也, 岩田想, ヒスタミン H1 受容体の結晶構造解析, 平成 24 年度日本生化学会九州支部例会, 2012.05.27

2. 白石充典, 島村達郎, 辻本浩一, 浅田秀基, 小林(万木)貴美, 小林拓也, 岩田想, GPCR の立体構造解析に向けた戦略: ヒスタミン H1 受容体を例に, 日本薬学会第 132 年会, 2012.03.29.

3. 白石充典, ヒト由来ヒスタミン H1 受容体の結晶構造解析, 第 21 回 WS フォーラム, 2011.11.19.

4. 望月志保, 白石充典, 阿部義人, 津田誠, 井上和秀, 植田正, ヒト P2X4 受容体細胞外ドメインを認識するモノクローナル抗体の作製, 第 84 回日本生化学会大会, 2011.09.22.

5. 白石充典, 辻本浩一, 浅田秀基, 島村達郎, 小林(万木)貴美, 小林拓也, 岩田想, GPCR の構造解析に向けた安定化改変体の作製・評価系の確立, 第 84 回日本生化学会大会, 2011.09.24.

6. 白石充典, 辻本浩一, 浅田秀基, 島村達郎, 小林(万木)貴美, 小林拓也, 岩田想, 立体構造解析を目指した膜蛋白質改変体作製プラットフォーム, 日本化学会東北支部 平成 23 年度化学系学協会東北大会, 2011.09.17.

7.白石充典, 島村達郎, 辻本浩一, 浅田秀基, 小林(万木) 貴美, 小林拓也, 岩田想, GPCR の構造研究に向けた高発現・安定化改変体作製プラットフォーム, 第 11 回日本蛋白質科学会, 2011.06.08.

8.白石充典, 島村達郎, 浅田秀基, 小林(万木) 貴美, 小林拓也, 岩田想, GPCR の構造研究に向けた高発現改変体作製プラットフォームの確立, 平成 23 年度日本生化学会九州支部例会, 2011.05.22.

〔図書〕(計 0 件)  
なし

〔産業財産権〕  
○出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://meneki.phar.kyushu-u.ac.jp/Protein/TOP.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

白石充典 (SHIROISHI MITSUNORI)  
九州大学・大学院薬学研究院・助教  
研究者番号: 00380527

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号: